

LUMIÈRE ET RÉGÉNÉRATION DES PROTOPLASTES DE *DRAPARNALDIA MUTABILIS* (CHAETOPHORALES, CHLOROPHYTA)

M. LARPENT-GOURGAUD, M.P. AUMAITRE et A.A. HARCHALI

Laboratoire de Microbiologie, 4, rue Ledru,
63038 Clermont-Ferrand Cedex

RÉSUMÉ - Maintenus à l'obscurité, les protoplastes de *Draparnaldia mutabilis* sont incapables de régénérer et meurent. Les radiations rouge clair (655nm \pm 10nm) contrôlent la restauration de la paroi qui est achevée après six jours d'irradiation. Sept jours de traitement sont inhibiteurs pour la régénération d'un thalle normal. En lumière blanche ou sous radiations rouge clair, les protoplastes régénèrent quelle que soit l'énergie reçue. Sous radiations bleues ou jaunes, les protoplastes édifient un court tube germinatif uniquement sous une photopériode de 18 heures/24 heures. C'est dans le bleu et le rouge pour une photopériode de 18/24 heures que le développement du thalle régénéré est le meilleur. Même à forte énergie lumineuse, la croissance est toujours nulle sous radiations jaunes (589nm).

ABSTRACT - The protoplasts of *Draparnaldia mutabilis* died in darkness. After 6 days of red pretreatment (655nm \pm 10nm), cell walls regenerated and thallus growth is possible. Seven days treatment is inhibitory. Under white or red irradiations, protoplasts regeneration is energy independent. Under blue and yellow irradiations, this phenomenon is a photoperiodic long days event. Thallus growth is very good under blue or red illuminations with long photoperiods. However growth is not possible under high yellow irradiance (589).

MOTS CLÉS : *Draparnaldia*, protoplaste, régénération, radiation, photopériode, paroi, rouge clair.

INTRODUCTION

Récemment, des protoplastes ont pu être obtenus chez *Draparnaldia mutabilis* (Roth) Cedergr (Larpent-Gourgaud & Aumaitre, 1987). L'étude de la régénération et la production de thalles filamenteux est une étape dans la compréhension de la mise en place de la polarité cellulaire et de la localisation intracytoplasmique d'enzymes directement impliqués dans la

morphogenèse. Si les protoplastes régénèrent, quelle que soit la nature de l'éclairement, seules les lumières blanche, bleue et rouge leur permettent d'engendrer des thalles à croissance normale (Larpen-Gourgaud & Aumaitre, 1988). Les radiations jaunes n'autorisent qu'une croissance limitée dans le temps.

Le facteur lumière est donc très important dans le contrôle de la régénération des protoplastes et dans le développement des thalles chlorophylliens régénérés. Plusieurs composantes de ce facteur sont à prendre en considération: la nature des radiations, l'énergie lumineuse et le photopériodisme. Le développement algal peut être en effet sensible au photopériodisme (Ducher et al., 1975). De plus, de nombreuses réactions morphogénétiques sont également contrôlées par la lumière (Dring, 1988).

Notre travail a donc tenté d'élucider le rôle de diverses radiations du spectre lumineux sur la régénération et le développement des protoplastes de *Draparnaldia mutabilis*. Cette étude n'est possible que si les protoplastes sont capables de se développer dans un milieu contrôlé et dépourvu d'osmorégulateurs.

Nous avons donc, dans un premier temps, mis au point un prétraitement des protoplastes par des radiations rouges permettant de supprimer cette exigence. Il nous a ensuite paru utile d'analyser, pour mieux les comprendre, les réactions de ces systèmes à la lumière blanche et à quelques éclaircissements monochromatiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Draparnaldia mutabilis est maintenu en culture axénique sur un substrat liquide organique (BE), à base d'extraits de viande et de bactopeptone (Larpen & Jacques, 1973). Ce substrat peut être gélosé à 15.1000. Les protoplastes sont obtenus suivant la technique mise au point par Larpen-Gourgaud & Aumaitre (1987).

La photomorphogenèse et les phénomènes de régénération conduisant à la formation d'un thalle sont suivis sur la suspension de protoplastes étalée sur le milieu BE ou BE supplémenté en saccharose (60g/l) et montée stérilement en cellule de Van Tieghem, sous les conditions de température de $18,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ et de photopériode de 18 heures.

L'éclairement peut être de 13 ou de 23 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ selon l'expérience. Il est fourni par des tubes fluorescents de type "blanc industrie". Les éclaircissements rouges (RC = $655\text{nm} \pm 10\text{nm}$) et bleus ($440\text{nm} \pm 15\text{nm}$) sont donnés par des tubes fluorescents (Philips TL 15 pour le rouge et TL 18 pour le bleu). La lumière jaune (589nm) est obtenue à l'aide d'une lampe à vapeur de sodium basse pression Mazda (DUC 1 x 18 C-S10 -IPG 57). Les radiations rouge sombre (RS) de 730nm sont fournies par des lampes à

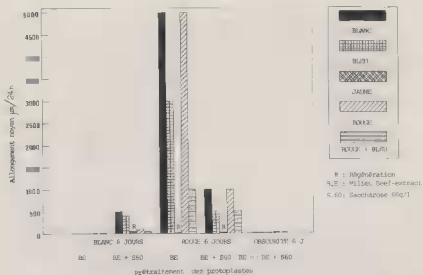


Figure 1: Action comparée du prétraitement des protoplastes par des lumières blanche et rouge sur leur régénération et la croissance des thalles. Cultures âgées de 19 jours sur milieu BE supplémenté ou non en saccharose (S 60). $E = 23 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Photopériode = 18 heures/24 heures.

incandescence avec filtre de gélatine "Kodak" et filtres anticaloriques "Schot".

Les éclaircissements sont mesurés à l'aide d'un Quantum Sensor "Li-Cor" pour les longueurs d'onde comprises entre 400 et 700nm. Pour les radiations rouge sombre, on utilise une thermopile "Kipp et Zonen" type compensé CA, couplée à un galvanomètre ("Kipp et Zonen" AL₄).

RÉSULTATS

Par régénération, il faut entendre la prise en compte de la première division du protoplaste engendrant un tube germinatif de $10 \mu\text{m}$ environ.

Action des radiations rouges sur la régénération et le développement des protoplastes

Les mesures effectuées sur plus d'une centaine d'échantillons donnent des résultats résumés dans la figure 1.

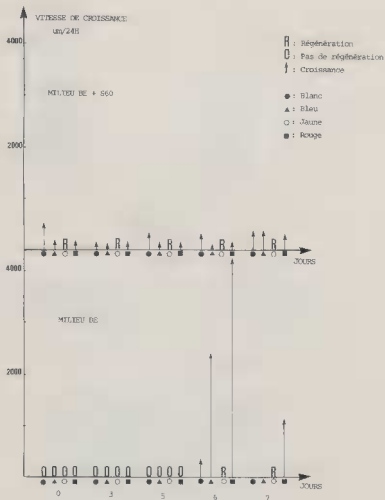


Figure 2: Action comparée d'un prétraitement des protoplastes par la lumière rouge sur leur régénération et la croissance des thalles sur milieu BE ou BE plus saccharose 60g/l.

a) - Maintenus à l'obscurité pendant 6 jours, les protoplastes sont incapables de régénérer et meurent.

b) - Traités 6 jours par la lumière blanche, ($23\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) puis cultivés:

- sur milieu saccharosé (BE - S60), les protoplastes restent viables, s'entourent d'une paroi et régénèrent.

- sur milieu non saccharosé (BE), la lumière blanche donnée en prétraitement ne permet pas de maintenir en vie les protoplastes qui éclatent et meurent.

c) - Traités 6 jours par la lumière rouge (RC $23 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) puis cultivés sur milieu BE saccharosé ou non, les protoplastes régénèrent quelle que soit la qualité de l'éclairage et produisent un thalle normal sauf en lumière jaune où la croissance n'est pas initiée. Il est donc évident que les radiations RC contrôlent les réactions de biosynthèse de la paroi et évitent ainsi aux protoplastes d'éclater dans un milieu dépourvu d'osmorégulateur (saccharose).

Le prétraitement par la lumière rouge a été réalisé pendant 3, 4, 5, 6 et 7 jours avant l'ensemencement des protoplastes sur milieu supplémenté ou non en sucre (Figure 2). Sur milieu saccharosé, il est évident que le prétraitement n'apporte rien: tous les protoplastes synthétisent une paroi et régénèrent un thalle sous un éclairage blanc, bleu, jaune et rouge. Au contraire, sur milieu non saccharosé, les protoplastes ne régénèrent pas et meurent si le traitement est inférieur à 5 jours. L'optimum est très strictement défini car à 5 jours, il n'existe aucune survie possible et après 7 jours les radiations rouges deviennent partiellement inhibitrices au moins pour le développement ultérieur sous éclairage blanc et bleu, pour le devenir totalement au 11^{ème} jour sous toutes les longueurs d'onde utilisées (Figure 3). La vitesse optimale des thalles est atteinte après 6 jours de prétraitement des protoplastes (Figure 2 A et B). Cette vitesse de croissance (4,3mm/24 heures) est multipliée par un facteur 15, comparée à celle obtenue en lumière blanche (0,3mm/24 heures) avec ou sans glucides (Figure 2).

Au-delà, le RC devient inhibiteur. Si le prétraitement est prolongé jusqu'à 11 jours, toute croissance devient impossible. Le protoplaste devient incapable d'engendrer un tube germinatif et donc un thalle chlorophyllien.

Cultivée sous éclairage bleu, l'algue est stimulée (Figure 2) par un prétraitement prolongé de 6 jours au RC. Ceci s'explique au vu des résultats de Larpent *et al.*, qui ont montré la complémentarité des radiations bleues et rouges (Larpent *et al.*, 1972) pour le développement de *Draparnaldia mutabilis*. L'échantillon traité en lumière rouge est encore plus stimulé (Figure 2).

En conclusion, comme dans les protoplastes végétaux, ceux de *Draparnaldia* sont sensibles à la pression osmotique du milieu. L'absence de saccharose entraîne leur destruction. La survie et la régénération des protoplastes est possible si le milieu a une pression osmotique convenable, sous toutes les radiations testées, y compris les jaunes inefficaces pour la photosynthèse. Une irradiation rouge clair pendant 6 jours permet de s'abs-

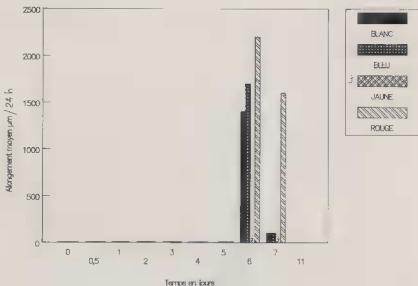


Figure 3: Cinétique de l'action de la lumière rouge sur la régénération des protoplastes et sur la croissance des thalles. Cultures de 14 jours sur milieu BE.

traire de la présence de stabilisateurs osmotiques dans le milieu. La régénération devient possible sous les différents éclaircements, même dans le jaune, où malgré la présence de sucre, le phénomène ne peut avoir lieu sans prétraitement.

Rôle de la valeur de l'éclaircissement et de la photopériode sur la régénération des protoplastes

Le facteur lumière joue un rôle important dans la morphogenèse des algues et peut agir, par l'énergie, la qualité de la lumière ainsi que le rythme d'éclaircissement (Dring, 1988). Les protoplastes représentent un système simple et homogène pour analyser ces phénomènes comme l'ont démontré plusieurs auteurs chez les végétaux supérieurs (Kaiser & Heber, 1983; Nishimura & Akazawa, 1975; Rothman & Zilinskas, 1977).

A l'obscurité, les protoplastes éclatent et meurent. Suivant la qualité de la lumière, on distingue deux types de réaction :

a) - en lumière blanche ou sous radiations rouge claire, les protoplastes régénèrent quelle que soit l'énergie reçue (Figure 4).



Figure 4: Action de la valeur de l'éclairement et de la photopériode sur la régénération des protoplastes en fonction des conditions d'éclairement. Milieu de culture: BE + saccharose 60g/l.

b) - sous radiations bleues ou jaunes, les protoplastes édifient un court tube germinatif aussi bien à 13 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ qu'à 23 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mais uniquement sous une photopériode de 18 heures.

Ces résultats tendent à démontrer que la régénération est indépendante de l'énergie reçue, mais qu'elle se classe dans les phénomènes photopériodiques "de type jour long" pour les irradiations bleues ou jaunes.

Rôle de la valeur de l'éclairement et de la photopériode sur la croissance des thalles régénérés

Rôle de la valeur de l'éclairement

Les radiations jaunes provoquent une absence de stimulation de la croissance du thalle, même si le protoplaste régénère, le thalle ne se développe pas (Figure 4).

C'est dans le bleu, puis le rouge à 23 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pour une photopériode de 18 heures/24 heures, que le développement est le meilleur, comparé à celui obtenu à 13 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le bleu est toutefois un peu moins efficace que le rouge à 13 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, c'est l'inverse à 23 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Sous 12 heures d'éclairement, les radiations rouges ne permettent pas la croissance du thalle lorsque l'énergie n'atteint que 13 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Au

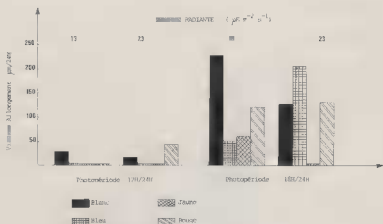


Figure 5: Action de la valeur de l'éclairement et de la photopériode sur la croissance des thalles régénérés.

contraire, à $23 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la croissance dans le rouge n'est pas négligeable alors qu'elle est encore nulle dans le bleu.

Rôle de la photopériode

Les photopériodes longues de 18 heures sont favorables à la croissance des thalles par rapport à ce qui est observé pour des photopériodes de 12 heures (figure 5). A forte énergie, la croissance est toujours nulle sous radiations jaunes.

DISCUSSION - CONCLUSION

1°) A l'obscurité, les protoplastes ne régénèrent pas et meurent. Quelle que soit la longueur d'onde, à la lumière, la survie et la régénération des protoplastes n'est possible que si le milieu a une pression osmotique convenable. Un prétraitement par irradiation rouge clair des protoplastes pendant 6 jours permet de s'abstraire totalement de la présence de stabilisateurs osmotiques dans le milieu : la régénération devient possible sous les différents éclairagements sur un milieu dépourvu de glucide.

Draparnaldia mutabilis comme un certain nombre d'algues filamenteuses est très sensible aux chocs thermiques ou lumineux (Kerimian

& Larpent, 1972; Van Beem & Simons, 1988). Il n'est donc pas surprenant de constater que de brefs prétraitements en RC (0-3 jours) induisent des croissances plus faibles que des traitements plus prolongés de 3 à 5 jours. Au-delà de 6 jours, le RC est inhibiteur et son action modifie donc durablement la cellule. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Zeghal (1987). Les résultats obtenus en microscopie électronique démontrent que les irradiations RC contrôlent la mise en place et la restauration de la paroi. Des globules de polysaccharides s'accumulent sous la membrane cytoplasmique avant la régénération (Didier et al., sous presse). Des dosages de sucres solubles et insolubles sur des algues âgées de 10 jours montrent une augmentation de 40% de chacun d'eux lorsque les protoplastes ont préalablement été traités 6 jours par le rouge clair. Ceci est en conformité avec le rôle important attribué aux radiations rouges par Ducher (1987) sur la synthèse des polysaccharides au cours du développement du thalle de *Draparnaldia* et permet d'envisager leur effet protecteur contre un milieu hypoosmotique. Les radiations bleues au contraire stimulent la synthèse des protéines.

2°) Les radiations jaunes permettent la régénération des protoplastes mais non la croissance des thalles. Sous cette irradiation, *Draparnaldia* peut survivre pendant deux semaines environ (Ducher, 1987), mais les structures chloroplastiques dégèrent (Ducher, 1988). Les thalles acquièrent une activité phosphoénoypyruvate carboxykinase qui n'existe pas chez les algues témoins (Ducher & Dubost, 1989). Ces résultats suggèrent aux auteurs une survie photohétérotrophique de *Draparnaldia* qui n'autorise cependant pas une croissance prolongée.

3°) La régénération est indépendante de l'énergie lumineuse reçue par les cellules, quelle que soit la photopériode, pour les lumières blanche et rouge clair. Cependant des expériences ultérieures devront être effectuées à des éclaircissements plus faibles que $13 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cette valeur est peut être trop forte et masque l'effet photopériode. Il sera important de savoir si cette réaction est de type "jour dominant" ou typiquement "jour long" avec sensibilité à la coupure de la nuit. Il sera de plus nécessaire d'analyser l'effet négatif éventuel du rouge et/ou du bleu sur la régénération.

4°) La régénération des protoplastes est cependant un phénomène photopériodique pour les irradiations bleues ou jaunes. Pour une même énergie totale, les photopériodes de type "jour long" sont seules efficaces. Ceci est peut-être à rapprocher des exigences de la plante entière qui a été définie comme un organisme de type "jour long" (Ducher, 1987; Larpent & Jacques, 1973).

5°) Contrairement à la régénération qui se produit indépendamment de la qualité de la lumière, la croissance ne se manifeste que sous certains éclaircissements (blanc, bleu et rouge), alors que d'autres, comme le jaune, inhibent totalement le développement du thalle. L'énergie lumineuse est importante pour la croissance des thalles régénérés. Ceci n'est pas étonnant comp-

te tenu de la mise en place des cellules photosynthétiques composant les axes chlorophylliens. Il serait intéressant de savoir si les radiations rouges sont antagonistes, synergiques ou additives pour les radiations bleues dans leur action sur la croissance des thalles régénérés. Enfin, des expériences ultérieures devront permettre de dégager les rôles respectifs des divers photorécepteurs impliqués dans la morphogénèse des thalles de *Draparnaldia mutabilis*: cryptochrome, phytochrome, pigments chlorophylliens.

BIBLIOGRAPHIE.

- DE MARCH G. & TREMOLIERES A., 1985 - Protoplasts growth and photoregulation. In PILET P.E. (Ed.), "The physiological properties of plant protoplasts" Springer Verlag, pp. 258-266.
- DIDIER P., LARPENT-GOURGAUD M. & AUMAITRE M.P. (sous presse) - Regeneration of the cell wall in protoplasts of *Draparnaldia mutabilis* (Roth) Cederg. (Chaetophorales, Chlorophyta). *Cytobios*
- DRING M.J., 1988 - Photocontrol of development in algae. *Ann. Rev. Pl. Physiol. Mol. Biol.* 39: 157-174.
- UCHER M., LARPENT-GOURGAUD M. & LARPENT J.P., 1975 - La notion de photopériodisme chez trois Chlorophycées et une Rhodophycée. *Nova Hedwigia* 26: 373-383.
- UCHER M., 1987 - Rôle de la lumière sur la morphogénèse et le métabolisme du thalle de *Draparnaldia mutabilis* Roth (Cederg.). Thèse Doct. Etat Univ. Clermont II. 145p.
- UCHER M. & DUBOST G., 1989 - Radiations jaunes et croissance de *Draparnaldia mutabilis*. *Pl. Physiol. Biochem.* 27 (4): 1-3.
- KAISER G. & HEBER V., 1983 - Photosynthesis of leaf cell protoplasts and permeability of the plasmalemma to some solutes. *Planta* 57: 462-470.
- KERIMIAN T. & LARPENT J.P., 1972 - Problèmes posés par la croissance et le développement d'une Chaetophorale, *Draparnaldia mutabilis* Roth (Cederg.). *Nova Hedwigia* 23: 225-235.
- LARPENT-GOURGAUD M., LARPENT J.P. & JACQUES R., 1972 - Action de quelques radiations monochromatiques sur la croissance du thalle d'une Rhodophycée. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 274: 2988-2990.
- LARPENT J.P. & JACQUES R., 1973 - Influence de la durée de l'éclaircissement sur la croissance du thalle de quelques algues (trois Chaetophorales et une Rhodophycée). *Pl. Sci. Lett.* 1: 339-347.
- LARPENT-GOURGAUD M. et AUMAITRE M.P., 1987 - Production et régénération de protoplastes chez *Draparnaldia mutabilis* (Chaetophorales, Chlorophyta). *Cryptogamie, Algol.* 8: 101-106.
- LARPENT-GOURGAUD M. & AUMAITRE M.P., 1988 - Action comparée de diverses radiations monochromatiques sur la régénération et le développement des protoplastes de *Caespitella pascheri* et de *Draparnaldia mutabilis* (Chaetophorales, Chlorophyta). *Cryptogamie, Algol.* 9: 143-147.

- NISHIMURA M. & AKAZAWA T., 1975 - Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. *Pl. Physiol.* (Bethesda), 55: 712-716.
- ROTHMAN E.K.M. & ZILINSKAS B.A., 1977 - Reversal of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-1-dimethylurea of carbon dioxide fixation in spinach chloroplasts and protoplasts by dicarboxylic acids. *Pl. Physiol.* 60: 51-53.
- VAN BEEN A.P. & SIMONS J., 1988 - Growth and morphology of *Draparnaldia mutabilis* (Chlorophyceae, Chactophorales) in synthetic medium. *Brit. Phycol. J.* 23: 143-151.
- ZEGHAL M., 1987 - Contribution à l'étude du rôle de la lumière sur le développement du thalle de *Draparnaldia mutabilis* (Roth) Cederx. Thèse Docteur Ingénieur. Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand. 56p.